

Procédé et dispositif de culture de cellules vivantes par couplage d'un récipient bioréacteur avec un automate de sélection

5                   La présente invention concerne un procédé et un dispositif de culture de cellules vivantes par couplage d'un récipient bioréacteur avec un automate de sélection.

                  Le traitement des déchets est une préoccupation de plus en plus constante des citoyens et des gouvernements. Une partie importante des  
10 traitements est effectuée dans des usines mettant en œuvre des cuves inoculées par une flore bactérienne. Mais la flore bactérienne évolue dans le temps et cette évolution est souvent défavorable aux réactions que l'on souhaite voir intervenir dans les cuves.

                  Le problème de la dérive des cultures bactériennes est un  
15 problème général que l'on trouve par exemple dans l'industrie pharmaceutique. Dans cette industrie, on évite la dérive en opérant de manière stérile.

                  Mais il est inconcevable économiquement de travailler dans de telles conditions par exemple dans une usine de traitement des déchets.

                  Les dispositifs de culture tels que mis en œuvre dans l'industrie,  
20 pour la production de métabolites d'intérêt commercial, ou la biodégradation de déchets ou d'eaux usées par exemple, sont confrontés au problème de la contamination par des espèces provenant du milieu extérieur. La conduite des cultures sous conditions stériles qui impliquent le confinement total des équipements est une solution au problème de la contamination par des espèces  
25 extérieures, mais elle est difficile à envisager pour des raisons de coût de traitement dans les applications telles que la biodégradation de déchets, ou même impossible à mettre en œuvre dans des utilisations extensives de populations microbiennes telles que dans le lagunage par exemple.

                  Par ailleurs, WO 00/34433 décrit une technique qui permet la  
30 sélection et la prolifération accélérée de cellules vivantes en suspension. En maintenant un régime de concentration de cellules constant (turbidostat) sur des périodes illimitées, le dispositif décrit se comporte donc comme un procédé

de sélection automatisée qui en même temps élimine les variants statiques de cellules vivantes, c'est-à-dire les cellules vivantes qui stagnent dans les conduites et les récipients et privilégie les variants dynamiques restant en suspension, qui sont de mieux en mieux adaptés aux conditions de culture.

5 L'industrialisation d'un tel dispositif en vue de traiter des volumes de plusieurs m<sup>3</sup>, voire plusieurs dizaines ou centaines de m<sup>3</sup> peut s'envisager par simple homothétie mais son fonctionnement en serait rendu coûteux pour plusieurs raisons :

- 10 - les moyens mis en œuvre pour le transfert périodique d'une cuve à l'autre ainsi que le transfert périodique des fluides de stérilisation et de rinçage et des additifs de culture consomment de l'énergie,
- une consommation importante de fluides de stérilisation et de rinçage,
- l'utilisation d'une seule cuve à la fois, l'autre restant en attente donc étant inutile au procédé. Elle doit cependant posséder tous les équipements
- 15 nécessaires au développement de la culture : régulation de température, système de stérilisation, système d'agitation, etc.
- la difficulté de lire en continu la turbidité dans un récipient bioréacteur de grande taille avec des densités de culture importantes.

Pour ces raisons, la biodégradation des eaux usées met en œuvre

20 à ce jour des populations bactériennes diverses dont la nature échappe au contrôle de l'opérateur, et sans qu'il soit possible de n'utiliser que les espèces sélectionnées pour leur performance ou leur efficacité par rapport au substrat, c'est-à-dire aux composés à dégrader présents dans les eaux usées.

Il serait donc souhaitable de disposer d'une technique notamment

25 de biodégradation des eaux usées permettant de mettre en œuvre essentiellement les espèces sélectionnées pour leur performance ou leur efficacité par rapport aux composés à dégrader présents dans les eaux usées.

Or, après de longues recherches la demanderesse a découvert un procédé permettant de reproduire et de contrôler les conditions de prolifération

30 dans un récipient bioréacteur de grande dimension, ou dans un milieu naturel tel qu'une lagune ou un plan d'eau par exemple, et fonctionnant de manière continue, semi-continue ou discontinue, sans avoir recours au confinement et à

la stérilisation, et en privilégiant les variants dynamiques de cellules vivantes, qui sont de mieux en mieux adaptées aux conditions de culture.

Ce procédé est essentiellement fondé sur la coopération entre un récipient bioréacteur et un dispositif de sélection automatique de cellules  
5 vivantes.

C'est pourquoi la présente demande a pour objet un procédé de traitement en continu, semi-continu ou discontinu d'un substrat, dans lequel ledit substrat installé dans un récipient bioréacteur est soumis à l'action d'une culture de cellules vivantes C1 permettant d'effectuer une réaction R1 sur ledit  
10 substrat et dans lequel on inocule périodiquement et de préférence régulièrement le milieu à l'aide de cellules vivantes C2 améliorant ladite réaction, lesdites cellules vivantes C2 étant issues d'une sélection effectuée par un dispositif de sélection automatique, de préférence exclusivement en suspension, d'une population de cellules vivantes dynamiques et ledit dispositif  
15 de sélection automatique de cellules vivantes étant alimenté soit par un substrat différent soit par le même substrat que le récipient bioréacteur et étant inoculé à l'origine par les cellules vivantes C1 présentes dans la cuve du récipient bioréacteur, et dans lequel avantageusement on prélève des cellules vivantes dans la cuve du récipient bioréacteur pour les transférer dans le dispositif de  
20 sélection automatique.

On peut ajouter, si désiré, au dispositif de sélection ou au récipient bioréacteur, à tout moment, d'autres cellules vivantes, par exemple pour augmenter la concentration cellulaire ou introduire de nouvelles espèces.

Dans la présente demande et dans ce qui suit, le terme « cellules  
25 vivantes dynamiques » désigne des cellules vivantes proliférant en suspension et soumises à une sélection dirigée (à l'inverse des « cellules vivantes statiques », désignant des cellules vivantes adhérant à la surface des récipients et conduites, échappant ainsi à la sélection). On élimine avantageusement périodiquement les cellules vivantes statiques.

30 Généralement, on utilisera comme cellules vivantes C2 les cellules vivantes proliférant en suspension et soumises à une sélection dirigée. Dans certaines applications, on utilisera comme cellules vivantes C2 non pas

les cellules vivantes dynamiques, mais les cellules vivantes statiques.

Le substrat permet le maintien des cultures de cellules vivantes C1, C2, etc.

Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre de l'invention, le dispositif de sélection automatique des cellules vivantes dynamiques, comporte :

- deux récipients ou plus permettant de recevoir et maintenir des cultures de cellules vivantes en suspension,
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter séparément ces récipients en fluides de stérilisation, de nettoyage ou de neutralisation
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter ces récipients en gaz
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter ces récipients en substrat
- un ensemble de moyens permettant de transférer le contenu d'un récipient dans l'autre et vice-versa
- un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients vers un autre dispositif tel qu'un récipient bioréacteur
- un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients vers une poubelle.

Au début de la mise en œuvre, des cellules vivantes C1 sont présentes dans la cuve récipient bioréacteur et dans le dispositif de sélection automatique. Au cours du temps, le dispositif de sélection privilégie (sélectionne) l'apparition et la prolifération de variants de cellules vivantes dynamiques C2, toujours mieux adaptées aux conditions de cultures et contre-sélectionne les cellules vivantes C1 moins bien adaptées. Les cellules vivantes C2 sont transférées dans le récipient bioréacteur où elles entrent en compétition avec les cellules vivantes C1 puis les supplantent. A la fin, on constate que la population de cellules vivantes C1 a été remplacée par les cellules vivantes C2. De préférence, en parallèle, on prélève des cellules vivantes dans la cuve du récipient bioréacteur pour les transférer dans le dispositif de sélection automatique.

Le dispositif de sélection automatique de cellules vivantes dynamiques comporte notamment

- (a) au moins un premier et au moins un deuxième récipient de culture destinés à recevoir une culture
- (b) une source de gaz;
- (c) une source de milieu;
- 5 (d) une source pour un agent stérilisant; et
- (e) un système de conduites comportant des moyens pour relier au choix l'un des deux récipients de culture à la source de milieu tels que des vannes ainsi que les deux récipients de culture entre eux et pour relier au choix l'autre récipient de culture à la source de l'agent stérilisant.

10 Le gaz utilisé peut être adapté aux cellules vivantes aérobies ou anaérobies.

Dans d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre de l'invention, entre les deux récipients de culture sont prévues deux conduites de liaison qui comportent un tronçon de conduite commun.

15 Dans d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre de l'invention, sur le tronçon de conduite commun est prévue une conduite d'évacuation par laquelle on peut prélever les cultures des récipients de culture. Les cellules vivantes C2 améliorant la réaction sont de préférence prélevées par cette conduite.

20 Dans encore d'autres conditions préférentielles de mise en œuvre de l'invention,

- le dispositif bioréacteur et le dispositif de sélection automatisé sont alimentés avec le même substrat,
- le bioréacteur fonctionnant en continu, le débit d'alimentation en substrat
- 25 appliqué sur la ligne d'arrivée de substrat est identique à celui appliqué à la ligne de soutirage de milieu de culture.

Un dispositif de sélection génétique automatisé de cellules vivantes C2 utilisable est notamment celui décrit dans WO-A-00/34433 et qui peut fonctionner suivant des conditions de culture telles que le dispositif de

30 sélection privilégie toujours les cellules vivantes variantes dites «dynamiques» qui sont de mieux en mieux adaptées aux conditions de culture maintenues dans le récipient bioréacteur.

Parallèlement au fonctionnement du bioréacteur, on transfère de façon périodique tout ou partie de la culture présente dans le dispositif de sélection automatisé vers le récipient bioréacteur.

Dans l'invention, on dispose donc en permanence d'une réserve  
5 de cellules vivantes variantes dynamiques de mieux en mieux adaptées aux conditions de culture pré-établies et imposées au récipient bioréacteur.

Les cellules vivantes variantes dynamiques à fort taux de croissance sélectionnées par le dispositif de sélection sont inoculées périodiquement dans le récipient bioréacteur où elles supplantent les cellules  
10 vivantes statiques à plus faible taux de croissance présentes dans la cuve.

Le rapport entre les taux de croissance des cellules vivantes présentes dans la cuve et des cellules vivantes à taux de croissance accru sélectionnées par le dispositif de sélection, fait que les cellules vivantes issues du dispositif de sélection supplantent rapidement les cellules vivantes présentes  
15 dans la cuve du bioréacteur.

En effet le taux de croissance des cellules vivantes issues du dispositif de sélection sera toujours au moins égal au taux de croissance maximum des cellules vivantes présentes dans le récipient bioréacteur.

En résumé, si au cours de la culture continue, le taux de  
20 croissance des cellules vivantes issues de l'automate de sélection est égal au taux de croissance des cellules vivantes présentes dans le récipient bioréacteur, alors l'ensemble des cellules vivantes évoluera en même temps ; s'il est supérieur, alors les cellules vivantes issues de l'automate de sélection prendront le pas sur celles déjà présentes dans le récipient bioréacteur.

25 Par ailleurs, en transférant périodiquement des cellules vivantes du récipient bioréacteur vers le dispositif de sélection automatisé, on a la certitude de mettre en compétition les deux populations de cellules vivantes et de sélectionner parmi les éventuelles variantes issues du récipient bioréacteur et celles du dispositif de sélection automatisé les cellules vivantes les mieux  
30 adaptées aux conditions du bioréacteur.

Les performances du procédé de bioconversion ou de biodégradation conduit dans le récipient bioréacteur sont donc au pire

maintenues mais habituellement améliorées en permanence grâce au remplacement périodique des cellules vivantes actives présentes dans le récipient bioréacteur par des cellules vivantes actives issues du dispositif de sélection automatisé, toujours plus performantes car toujours mieux adaptées

5 aux conditions de culture.

Par ailleurs l'inoculation étant répétée périodiquement et par conséquent avec des cellules vivantes de mieux en mieux adaptées aux conditions de culture, le dispositif de sélection automatisé garantit la prépondérance des cellules vivantes les plus actives vis-à-vis du substrat

10 présent dans le récipient bioréacteur.

Un dispositif de sélection automatisé de faible taille, par exemple doté de récipients de culture de 25 ml seulement, suffit à faire fonctionner efficacement un récipient bioréacteur tel que le bassin d'aération d'une station de traitement d'eau usée de 100 m<sup>3</sup>. Il est possible, bien sûr, d'utiliser des

15 récipients de culture de volume plus important, par exemple 1 litre.

Les cellules vivantes C2 utilisées améliorant la réaction de bioconversion peuvent notamment être produites par mise en œuvre d'un procédé comportant les étapes suivantes :

- (a) mise à disposition d'une culture dans au moins un premier récipient de
- 20 culture;
- (b) alimentation continue de la culture dans le premier récipient de culture avec du gaz à partir d'une source de gaz et réapprovisionnement régulier en liquides à partir d'une source de milieu,
- (c) transfert de la culture du premier récipient de culture par des conduites de
- 25 liaison dans au moins un second récipient de culture au moyen d'un circuit de conduite approprié,
- (d) connexion du premier récipient de culture avec une source pour un agent stérilisant, pour stériliser le premier récipient de culture,
- (e) enlèvement de l'agent stérilisant du premier récipient de culture,
- 30 (f) alimentation continue de la culture dans le second récipient de culture avec du gaz à partir de la source de gaz et réapprovisionnement régulier en liquides à partir de la source de milieu,

- (g) retour de la culture du second récipient de culture par les conduites de liaison dans le premier récipient de culture au moyen d'un circuit de conduite approprié,
- (h) connexion du second récipient de culture avec la source pour l'agent stérilisant, pour stériliser le second récipient de culture ; et
- (i) enlèvement de l'agent stérilisant du second récipient de culture.

Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre du procédé ci-dessus décrit, on répète au moins une fois les étapes (b) à (h).

Dans la présente demande et dans ce qui suit, le terme « récipient bioréacteur » désigne par exemple le bassin d'aération d'une station d'épuration, le bassin de méthanisation d'une unité de traitement biologique anaérobie, une lagune, un plan d'eau, une cuve par exemple de 0,5 litre à 100 m<sup>3</sup>, notamment de 1 litre à 100 m<sup>3</sup>, particulièrement de 5 litres à 50 m<sup>3</sup> et tout particulièrement de 10 litres à 50 m<sup>3</sup> ou un fermenteur par exemple de 0,5 litre à 100 m<sup>3</sup>, notamment de 1 litre à 100 m<sup>3</sup>, particulièrement de 5 litres à 50 m<sup>3</sup> et tout particulièrement de 10 litres à 50 m<sup>3</sup>.

Dans la présente demande et dans ce qui suit, le terme « substrat » désigne un milieu contenant un composé dont on envisage la conversion métabolique, en particulier une eau d'origine industrielle comme par exemple des eaux de lavage de cuves de stockage d'hydrocarbures, des eaux de lavage d'installations de productions d'intermédiaires pharmaceutiques, des eaux de rinçage de gâteaux de filtration, des eaux de lavage des fumées issues de productions chimiques, des effluents issus du dégivrage des aéronefs, une eau d'origine municipale comme par exemple des eaux usées domestiques, un polluant accidentel de l'environnement comme par exemple la présence en mer d'une nappe d'hydrocarbures ou d'autres produits chimiques provenant respectivement du naufrage d'un pétrolier ou d'un chimiquier, des effluents chimiques répandus sur le sol suite à un accident impliquant une citerne de transport (voie routière ou ferrée), des sols pollués aux métaux lourds ou à la dioxine.

Le terme « substrat » désigne aussi un composé dont on envisage la conversion métabolique comme par exemple le glucose servant à la



production de biomolécules d'intérêt industriel comme la lysine, le xanthane, les alginates, les polyols comme le glycérol, l'hygromycine, l'éthanol servant à la production de vinaigre par fermentation acétique, l'acide oxalique utilisé pour des applications de biohydrométallurgie, les pectines et les carraghénanes.

5 Le terme « substrat » désigne encore un milieu contenant des cellules vivantes ou mortes dont on envisage la conversion métabolique, par exemple une boue activée d'une eau résiduaire urbaine ou industrielle, des dérivés ligno-cellulosique issus de l'industrie papetière, des sous produits solides ou pâteux issus de l'industrie agroalimentaire, par exemple la biomasse  
10 végétale, en particulier herbe coupée), les drèches, les levures, les mélasses, ou encore des sous produits de l'industrie de la pêche tels que des dérivés chitineux, par exemple ceux issus de carapaces de crabes ou de crevettes.

Le terme « substrat » désigne également des molécules polluantes comme les composés organochlorés volatils (comme les solvants chlorés et les  
15 CFCs), les pesticides organochlorés (comme le DDT) ; les hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (comme les PCBs, dioxines et furanes) ; les solvants (comme le benzène, toluène, le xylène), les composés phytosanitaires organochlorés ou organophosphorés.

Le terme « cellules vivantes » désigne par exemple une ou  
20 plusieurs flores bactériennes comme *Sphingomonas wittichii* (qui catalyse la bioconversion de la dioxine), *Pseudomonas putida* (qui catalyse la bioconversion des cyanures et cyanates), *Agrobacterium radiobacter* (qui catalyse la bioconversion de pesticides comme le bromoxynil), certaines souches d'*Alcanivorax* ou d'*Acinetobacter* (capables de biodégrader de  
25 nombreux hydrocarbures aliphatiques), *Xanthomonas campestris* (qui est impliqué dans la biosynthèse du xanthane) ou *Sphingomonas paucimobilis* (qui est impliqué dans la biosynthèse du gellane).

Le terme « cellules vivantes » désigne aussi des cellules animales comme des cellules de mammifères (comme les cellules HEK-293) pour la  
30 production d'anticorps monoclonaux, de facteurs cellulaires de croissance des cellules d'insectes pour la production de protéines recombinantes ou de particules virales entomopathogènes (comme les cellules Sf9).

Le terme «cellules vivantes» désigne également des cellules végétales comme des cellules végétales de *Datura* pour la production d'alcaloïdes tropaniques (atropine, hyosciamine et scopolamine), des cellules végétales transgéniques pour la production de molécules d'intérêt industriel  
5 (comme la surproduction d'amidon par la pomme de terre).

Le terme « cellules vivantes » désigne aussi des algues comme les algues vertes appartenant aux espèces *Spirogyra* impliquées dans le traitement biologique d'effluents contenant des colorants comme le Reactive Yellow 22, des cultures de la micro-algue *Scenedesmus quadricauda* servant à  
10 la bioconversion de la progestérone, les micro-algues *Chlorella vulgaris* et *Coenochloris pyrenoidosa* intervenant dans la biodégradation de p-chlorophénol, la macro-algue *Microspora* capable d'éliminer le plomb.

Le terme «cellules vivantes» désigne de même des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* servant à la production de bioéthanol à  
15 partir du glucose ou à la production de xylitol à partir du glucose, *Candida tropicalis* YMEC14 servant à la biodégradation de composés phénolés (provenant de la production d'huile d'olive), *Candida famata* servant à la biodégradation de composés nitrilés.

Le terme «cellules vivantes» désigne tout autant des champignons  
20 comme *Penicillium janthinellum* capable de produire une xylanase, enzyme dépolymérisant le xylane, *Streptomyces clavuligerus* capable de produire la céphalosporine C à partir du glucose comme unique source de carbone, ou *Phanerochaete chrysosporium* capable de biodégrader les dioxine di- et tétrachlorées.

25 Le terme « cellules vivantes » désigne également des protozoaires comme *Euglena mutabilis* (protozoaire acidophile) impliqué dans la bioconversion de l'arsenic.

Le terme « cellules vivantes » désigne aussi un mélange de tous les types de cellules vivantes citées précédemment.

30 L'inoculation périodique en provenance du dispositif de sélection automatique de cellules vivantes est par exemple effectuée toutes les 48 heures, de préférence au moins une fois par semaine, particulièrement au

moins une fois par mois et tout particulièrement après chaque amélioration notable du taux de croissance des cellules vivantes C2.

Les procédés de traitement en continu, semi continu ou discontinu d'un substrat objet de la présente invention possèdent de très intéressantes  
5 qualités. Ils permettent notamment de contrôler biologiquement le fonctionnement d'un bioréacteur de conception classique en exerçant le contrôle des cellules vivantes présentes par élimination des cellules vivantes les moins adaptées au milieu de culture comme un contaminant ayant un taux de croissance inférieur à celui des cellules vivantes présentes dans le récipient  
10 bioréacteur par exemple. Il est donc possible de s'affranchir des contraintes de stérilité.

Un dispositif de sélection de faible taille, par exemple doté de récipients bioréacteurs d'un litre, suffit à faire fonctionner efficacement un récipient tel qu'un plan d'eau d'un volume de 4000 m<sup>3</sup>.

15 L'invention permet aussi d'améliorer l'efficacité d'un procédé de culture de conception classique en augmentant l'activité des cellules vivantes mises en œuvre dans le procédé sans refonte des dispositifs utilisés. On peut ainsi augmenter les rendements de production d'une molécule d'intérêt et/ou la vitesse de dégradation de substrats.

20 Ces qualités sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale.

Elles justifient l'utilisation des procédés ci-dessus décrits par exemple dans la biodégradation de composés récalcitrants. En effet aujourd'hui, un grand nombre de déchets issus de l'industrie de la chimie sont détruits par incinération à des coûts élevés et avec un risque environnemental  
25 important lié au risque d'émission dans l'atmosphère de composés dangereux pour l'homme et son environnement. Le traitement biologique de ces déchets (ou bioconversion) est souvent rendu impossible par les temps de traitement nécessaires ou par l'incapacité des cellules vivantes à métaboliser les composés présents dans le déchet, ou encore par l'effet inhibiteur de certains  
30 composés vis-à-vis de l'activité bactérienne en général.

Le dispositif de l'invention permet de maintenir dans un récipient bioréacteur dédié à la bioconversion de déchets, des cellules vivantes

spécifiquement adaptées et performantes vis-à-vis des composés présents dans le déchet et donc de rendre possible la bioconversion de déchets traditionnellement détruits par incinération.

En sélectionnant grâce au dispositif de sélection les cellules  
5 vivantes de mieux en mieux adaptées au milieu de culture, l'invention permet d'améliorer l'efficacité d'un procédé de culture de conception classique en augmentant l'activité des cellules vivantes mises en œuvre dans le procédé sans refonte des dispositifs de mise en œuvre.

Ces qualités justifient aussi l'utilisation des procédés ci-dessus  
10 décrits par exemple dans l'amélioration du fonctionnement des stations de traitement biologique des effluents. En effet, le bon fonctionnement des stations d'épuration des effluents urbains ou industriels peut être affecté par la présence accidentelle dans les effluents de composés récalcitrants vis-à-vis des cellules vivantes présentes. On peut prévoir de remédier à ce problème par adjonction  
15 d'un dispositif tel que décrit ci-dessus.

Le récipient bioréacteur est dans ce cas matérialisé par le bassin d'aération existant de la station d'épuration. L'alimentation du dispositif de sélection automatisé peut être réalisée par un piquage situé en amont du système d'aération dans un bassin de décantation primaire par exemple.  
20 L'inoculation réciproque du dispositif de sélection et du récipient bioréacteur est réalisée comme illustré ci-après à la figure 1. On peut également utiliser une ligne de connexion extérieure pour alimenter l'automate avec un substrat modifié par rapport au milieu prélevé en amont du bassin d'aération. Ce dispositif peut être utilisé pour enrichir les bassins d'aération en cellules  
25 vivantes adaptées à la biodégradation d'éventuels composés récalcitrants présents dans les effluents.

Ces qualités justifient aussi l'utilisation des procédés décrits ci-dessus par exemple dans l'amélioration des performances des biosynthèses. L'invention peut être à cet effet être utilisée pour l'amélioration des  
30 performances (rendement, temps de croissance) des procédés industriels de synthèse par biocatalyse.

Aujourd'hui, l'amélioration des performances des biosynthèses

reposant sur des fermentations, qu'elles soient en batch ou en continu, se fait par l'optimisation de la composition du milieu de culture et des paramètres physico-chimiques de la culture (Température, oxygénation, pH, etc.).

Ces développements sont longs et coûteux et de toutes façons  
5 limités par le métabolisme des cellules vivantes en présence.

L'invention, en agissant sur le métabolisme des cellules vivantes présentes permet d'adapter lesdites cellules vivantes aux conditions imposées par les impératifs technico-économiques et d'en accroître le taux de croissance, et donc par voie de conséquence d'augmenter les performances globales de la  
10 biosynthèse.

Dans le cas par exemple des levures dites osmotolérantes intervenant dans la production des polyols (sorbitol, mannitol, xylitol...), on observe des temps de culture variant de 4 à 5 jours sur des concentrations en glucose proches de 30 g/l.

On peut grâce à l'invention mettre les levures en contact avec des  
15 concentrations en glucose de plus en plus importantes de manière à orienter leur métabolisme naturel vers la production du métabolite extracellulaire ou intracellulaire désiré, tout en augmentant leur taux de croissance c'est-à-dire en diminuant les temps nécessaires à la culture.

Cette amélioration se traduit par une augmentation de la  
20 productivité des équipements utilisés et par une diminution du coût de revient de la biosynthèse.

Le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre sur de longues périodes et même indéfiniment.

La présente demande a aussi pour objet un dispositif de culture de  
25 cellules vivantes comprenant :

- A : un dispositif de sélection comprenant de préférence
  - deux récipients ou plus permettant de recevoir et maintenir des cultures de cellules vivantes en suspension,
- 30 - un ensemble de moyens permettant d'alimenter séparément ces récipients en fluides de stérilisation de nettoyage ou de neutralisation,
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter ces récipients en gaz,

- un ensemble de moyens permettant d'alimenter ces récipients en substrat,
- un ensemble de moyens permettant de transférer le contenu d'un récipient dans l'autre et vice-versa,
- 5    - optionnellement un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients vers un autre dispositif tel qu'un récipient bioréacteur,
- un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients vers une poubelle.
- 10   - B : un récipient bioréacteur,
- C : un système de moyens pour transférer des cellules vivantes entre le dispositif de sélection et le récipient bioréacteur,
- D : optionnellement une conduite comportant des moyens pour relier le récipient bioréacteur à un dispositif de séparation solide-liquide tel qu'un
- 15   décanteur,
- E : optionnellement une conduite d'évacuation du fluide (eau par exemple) traité
- F : optionnellement un dispositif de régulation de température.

Les moyens pour transférer le contenu d'un récipient dans l'autre et vice-versa peuvent être des moyens physiques comme des conduites ou des moyens humains effectuant des prélèvements dans l'un pour les transférer dans l'autre.

La présente demande a plus particulièrement pour objet un dispositif de culture de cellules vivantes par couplage avec un automate de

25   sélection de cellules vivantes comprenant :

- A : un dispositif de sélection de cellules vivantes comprenant
  - (a) au moins un premier et au moins un deuxième récipient de culture destinés à recevoir une culture
  - (b) une source de gaz,
  - 30   (c) une source de milieu,
  - (d) une source pour un agent stérilisant; et

(e) un système de conduites comportant des moyens pour relier au choix l'un des deux récipients de culture à la source de milieu tels que des vannes ainsi que les deux récipients de culture entre eux et pour relier au choix l'autre récipient de culture à la source de l'agent stérilisant.

- 5    -    B : un récipient bioréacteur
- C : un système de moyens pour transférer des cellules vivantes entre le dispositif de sélection et le récipient bioréacteur,
- D : optionnellement une conduite comportant des moyens pour relier le récipient bioréacteur à un dispositif de séparation solide-liquide tel qu'un
- 10    décanteur
- E : optionnellement une conduite d'évacuation du fluide (eau par exemple) traité.
- F : optionnellement un dispositif de régulation de température.
- 15    Dans des conditions préférentielles de mise en œuvre de l'invention,
- une ligne de soutirage est installée entre le récipient bioréacteur et le dispositif de sélection automatisé pour permettre de prélever des cellules vivantes présentes dans le récipient bioréacteur afin de les faire évoluer dans le dispositif de sélection automatisé,
- 20    -    une ligne d'inoculation est installée entre le dispositif de sélection automatisé et le récipient bioréacteur pour permettre d'ensemencer le récipient bioréacteur de manière répétée et régulière avec des cellules vivantes ayant évolué dans le dispositif de sélection automatisé,
- une ligne supplémentaire permet d'enrichir le milieu de culture de l'automate
- 25    avec un ou plusieurs additifs,
- un réservoir de collecte des effluents de rinçage et de stérilisation permet de recueillir les fluides de stérilisation et de rinçage du dispositif de sélection automatisé,
- un ensemble de pompes permet le transfert des différents fluides.

30                Les conditions préférentielles de mise en œuvre des procédés ci-dessus décrites s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus, notamment aux dispositifs pour leur mise en œuvre.

L'invention sera mieux comprise si l'on se réfère aux dessins annexés sur lesquels

- la figure 1 représente une vue schématique d'un dispositif de l'invention,
- la figure 2 représente une vue schématique d'un dispositif d'épuration  
5 biologique d'eaux usées,
- la figure 3 représente une vue schématique d'un dispositif de sélection automatisé décrit dans WO 00/34433.

Sur la figure 1, on peut observer un récipient bioréacteur 1 relié par un système de conduites retour 5 et aller 6 à un dispositif de sélection de  
10 cultures automatisé 2. Des pompes 13, 14 sont prévues sur ces conduites.

On peut aussi observer un réservoir tampon 11 de substrat alimenté extérieurement en substrat et relié par un système de conduites 4 d'une part au dispositif de sélection de cultures automatisé 2 et d'autre part au récipient bioréacteur 1. Des pompes 9, 10 sont prévues sur ces conduites.

15 Un réservoir 8 de collecte des effluents de rinçage et stérilisation du dispositif de sélection de cellules vivantes automatisé 2 est prévu. Une conduite d'arrivée d'additifs 12 est prévue pour l'addition dans le dispositif de sélection de cellules vivantes automatisé 2.

Le dispositif peut notamment fonctionner comme suit :

20 Le récipient bioréacteur 1 et le dispositif de sélection automatisé 2 sont alimentés avec le même substrat respectivement par les voies 3 et 4.

Le bioréacteur 1 fonctionnant en continu, le débit d'alimentation en substrat appliquée sur la ligne 3 est identique à celui appliqué à la ligne 7 correspondant au soutirage de milieu de culture. La ligne 7 peut conduire à un  
25 dispositif de séparation solide-liquide, non représenté, tel qu'un décanteur.

Une ligne d'inoculation 5 installée entre le dispositif de sélection automatisé 2 et le récipient bioréacteur 1 permet d'ensemencer le récipient bioréacteur 1 de manière répétée et régulière avec des cellules vivantes ayant évolué dans le dispositif de sélection automatisé 2.

30 Une ligne de soutirage 6 installée entre le récipient bioréacteur 1 et le dispositif de sélection automatisé 2 permet de prélever des cellules vivantes présentes dans le récipient bioréacteur 1 afin de les faire évoluer dans



le dispositif de sélection automatisé 2.

Une ligne supplémentaire 12 permet d'enrichir le milieu de culture de l'automate avec un ou plusieurs additifs.

Une poubelle 8 permet de recueillir les fluides de stérilisation et de  
5 rinçage du dispositif de sélection automatisé.

Un ensemble de pompes 9, 10, 13 et 14 permet le transfert des différents fluides.

Sur la figure 2, on peut observer un dispositif d'épuration biologique d'eaux usées.

10 On peut observer une partie des éléments ci-dessus, à savoir un récipient bioréacteur 1 qui est un bassin d'aération et un dispositif de sélection automatisé 2 alimentés avec le même substrat respectivement par les voies 3 et 4, des lignes d'inoculation et de soutirage 5 et 6 installées entre le récipient bioréacteur 1 et le dispositif de sélection automatisé 2, et une conduite 15  
15 comportant des moyens pour relier le récipient bioréacteur 1 à un dispositif de séparation solide-liquide, dans le cas présent un décanteur 16.

Sur la figure 3, on peut observer un premier et un deuxième récipient de culture 20, 21, destinés à recevoir une culture 22, une source de gaz 23, une source de milieu 24, une source 25 pour un agent stérilisant, et un  
20 système de conduites comportant des moyens pour relier au choix l'un des deux récipients de culture 20 ou 21 à la source de milieu 24 tels que des vannes ainsi que les deux récipients de culture 20, 21 entre eux et pour relier au choix l'autre récipient de culture 20 ou 21 à la source 25 de l'agent stérilisant. Les traits en gras représentent les conduites actives lors d'une des  
25 phases de mise en œuvre du procédé.

Ce dispositif permet la mise à disposition d'une culture 22 dans au moins un premier récipient de culture 20, l'alimentation continue de la culture 22 dans le premier récipient de culture 20 avec du gaz à partir d'une source de gaz 23 et réapprovisionnement régulier en liquides à partir d'une source de milieu  
30 24, le transfert de la culture 22 du premier récipient de culture 20 par des conduites de liaison 28-31 dans au moins un second récipient de culture 21 au moyen d'un circuit de conduite approprié, la connexion du premier récipient de

culture 20 avec une source 25 pour un agent stérilisant, pour stériliser le premier récipient de culture 20, l'enlèvement de l'agent stérilisant du premier récipient de culture 20, l'alimentation continue de la culture 22 dans le second récipient de culture 21 avec du gaz à partir de la source de gaz 23 et  
5 réapprovisionnement régulier en liquides à partir de la source de milieu 24, le retour de la culture 22 du second récipient de culture 21 par les conduites de liaison 28-31 dans le premier récipient de culture 20 au moyen d'un circuit de conduite approprié, la connexion du second récipient de culture 21 avec la source 25 pour l'agent stérilisant, pour stériliser le second récipient de culture  
10 21 et l'enlèvement de l'agent stérilisant du second récipient de culture 21.

Les exemples qui suivent illustrent la présente demande.

Exemple 1 : Bioconversion de déchets issus de la production de produits  
15 pesticides

On alimente en continu à un débit fixé de 0,75 mL/min un récipient bioréacteur de 5 litres utiles avec un substrat comprenant des déchets issus de la production de produits pesticides. L'analyse de ce déchet met en évidence les composés chimiques suivants : des alcools (ex : 2-butoxyéthanol), des  
20 alcanes (ex : propane-2,2-diméthoxy), des chlorophénols (ex : 2,4-dichlorophénol), des aromatiques (ex : 1,1'-biphényle, 1-méthylnaphtalène, 2-méthylnaphtalène, 2-éthylnaphtalène), des composés bromés (ex : benzonitrile-3,3-dibromo-4-hydroxy) et des pesticides (ex : 2,4-D-butoxyéthylester, MCP et MCPP). La demande chimique en oxygène de ce  
25 déchet est de 2450 mg/L. Le récipient bioréacteur est inoculé avec 10 mL d'un mélange de cellules vivantes de microorganismes isolées à partir de prélèvements provenant de différentes niches écologiques ou boues activées de stations d'épuration ; ces cellules vivantes sont sélectionnées parce qu'elles sont capables de dégrader les déchets.

30 Le régime continu est maintenu en fixant une DCO résiduelle de 1000 mg/L, ce qui représente un rendement de bioconversion stabilisé à 59,18 %.

Par ailleurs, on alimente également un dispositif de sélection automatisé du type décrit sur la figure 1 de WO-A-00/34433 muni de récipients de culture de 25 mL avec le même substrat et inoculé avec le même mélange de cellules vivantes que précédemment. Au départ, dans les deux récipients on a donc les mêmes cellules vivantes.

Dès que la consigne de turbidité est atteinte pour le système de sélection (détection au turbidostat), il est procédé automatiquement à l'inoculation du récipient bioréacteur par 10 mL du milieu présent dans le dispositif de sélection automatisé.

Après 9 semaines de fonctionnement, on constate que les cellules vivantes issues du dispositif de sélection automatisé, dont le taux de croissance a doublé durant cette période (passant de 0,009 à 0,018 h<sup>-1</sup>), ont remplacé la population de cellules vivantes présente à l'origine dans le récipient bioréacteur. A ce stade final, seulement deux microorganismes ont pu être identifiés comme étant *Delftia acidovorans* et *Pseudomonas putida* A.

Il a de ce fait été possible d'augmenter de 100 % le débit d'alimentation du fermenteur tout en maintenant le même rendement de bioconversion.

REVENDICATIONS

1. Un procédé de traitement en continu, semi-continu ou discontinu d'un substrat (24), dans lequel ledit substrat (24) installé dans un récipient bioréacteur (1) est soumis à l'action d'une culture de cellules vivantes C1 permettant d'effectuer une réaction R1 sur ledit substrat (24) et dans lequel on inocule périodiquement le milieu à l'aide de cellules vivantes C2 améliorant ladite réaction, lesdites cellules vivantes C2 étant issues d'une sélection effectuée par un dispositif de sélection automatique (2), d'une population de cellules vivantes dynamiques et ledit dispositif de sélection automatique (2) de cellules vivantes étant alimenté soit par un substrat différent soit par le même substrat (24) que le récipient bioréacteur (1) et étant inoculé à l'origine par les cellules vivantes C1 présentes dans la cuve du récipient bioréacteur (1), et dans lequel on prélève des cellules vivantes dans la cuve du récipient bioréacteur (1) pour les transférer dans le dispositif de sélection automatique (2).

2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dispositif de sélection automatique (2) des cellules vivantes dynamiques, comporte :

- deux récipients (20, 21) ou plus permettant de recevoir et maintenir des cultures de cellules vivantes en suspension,
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter séparément ces récipients en fluides de stérilisation (25), de nettoyage ou de neutralisation,
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter ces récipients en gaz (23),
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter ces récipients en substrat (24),
- un ensemble de moyens (28-31) permettant de transférer le contenu d'un récipient (20) dans l'autre (21) et vice-versa,
- un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients vers un autre dispositif tel qu'un récipient bioréacteur (1),
- un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients (20,21) vers une poubelle.

3. Un procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le dispositif de sélection automatique de cellules vivantes dynamiques comporte notamment :

- 5 (a) au moins un premier et au moins un deuxième récipient de culture (20, 21) destinés à recevoir une culture (22),
- (b) une source de gaz (23),
- (c) une source de milieu (substrat)(24),
- (d) une source (25) pour un agent stérilisant, et
- 10 (e) un système de conduites comportant des moyens pour relier au choix l'un des deux récipients de culture (20 ou 21) à la source de milieu (24) tels que des vannes ainsi que les deux récipients de culture (20, 21) entre eux, et pour relier au choix l'autre récipient de culture (20 ou 21) à la source (25) de l'agent stérilisant.

4. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 3 ,  
15 caractérisé en ce que les cellules vivantes C2 sont issues de la sélection effectuée parmi une population de cellules vivantes dynamiques exclusivement en suspension.

5. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le récipient bioréacteur (1) est un bassin d'aération d'une station  
20 d'épuration, le bassin de méthanisation d'une unité de traitement biologique anaérobie, une lagune, un plan d'eau, une cuve de 0,5 litre à 100 m<sup>3</sup> ou un fermenteur.

6. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les cellules vivantes C2 utilisées améliorant la réaction de  
25 bioconversion peuvent notamment être produites par mise en œuvre d'un procédé comportant les étapes suivantes :

- (a) mise à disposition d'une culture (22) dans au moins un premier récipient de culture (20),
- (b) alimentation continue de la culture (22) dans le premier récipient de culture  
30 (20) avec du gaz à partir d'une source de gaz (23) et réapprovisionnement régulier en liquides à partir d'une source de substrat (24),
- (c) transfert de la culture (22) du premier récipient de culture (20) par des

- conduites de liaison (28-31) dans au moins un second récipient de culture (21) au moyen d'un circuit de conduite approprié,
- (d) connexion du premier récipient de culture (20) avec une source (25) pour un agent stérilisant, pour stériliser le premier récipient de culture (20),
- 5 (e) enlèvement de l'agent stérilisant du premier récipient de culture (20),
- (f) alimentation continue de la culture (22) dans le second récipient de culture (21) avec du gaz à partir de la source de gaz (23) et réapprovisionnement régulier en liquides à partir de la source de milieu (24),
- (g) retour de la culture (22) du second récipient de culture (21) par les conduites
- 10 de liaison (28-31) dans le premier récipient de culture (20) au moyen d'un circuit de conduite approprié,
- (h) connexion du second récipient de culture (21) avec la source (25) pour l'agent stérilisant, pour stériliser le second récipient de culture (21), et
- (i) enlèvement de l'agent stérilisant du second récipient de culture (21).
- 15 7. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le substrat (24) est
- un milieu contenant un composé dont on envisage la conversion métabolique, par exemple une eau d'origine industrielle, une eau d'origine municipale par exemple des eaux usées domestiques, un polluant accidentel de
  - 20 l'environnement par exemple la présence en mer d'une nappe d'hydrocarbures ou d'autres produits chimiques, un effluents chimique répandu sur le sol, un sol pollué aux métaux lourds ou à la dioxine, ou
  - un composé dont on envisage la conversion métabolique par exemple le
  - 25 - un composé organochloré volatil, un pesticide organochloré, un hydrocarbure aromatique polycyclique halogéné ou un solvant.
8. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la cellule vivante comprend une ou plusieurs espèces bactériennes, des cellules animales ou végétales, des algues, des levures ou des
- 30 champignons.
9. Un procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'inoculation périodique en provenance du dispositif de sélection

automatique (2) de cellules vivantes est effectuée au moins une fois par semaine.

10. Un dispositif de culture de cellules vivantes comprenant :

- A : un dispositif de sélection de cellules vivantes C2 améliorant une réaction R1 de bioconversion d'un substrat (24), lesdites cellules vivantes C2 étant des variants dérivant de cellules vivantes C1, et lesdites cellules vivantes C2 produisant une réaction améliorée par rapport à celle produite par les cellules vivantes C1,
- B : un récipient bioréacteur (1)
- 10 - C : un système de conduites (5) comportant des moyens pour opérer des transferts du dispositif de sélection (2) vers le récipient bioréacteur (1) et un système de conduites (6) comportant des moyens pour opérer des transferts du récipient bioréacteur (1) vers le dispositif de sélection (2),
- D : optionnellement une conduite (15) comportant des moyens pour relier le
- 15 - récipient bioréacteur (1) à un dispositif de séparation solide-liquide tel qu'un décanteur (16),
- E : optionnellement une conduite d'évacuation du fluide (eau par exemple) traité,
- F : optionnellement un dispositif de régulation de température.

20 11. Un dispositif de culture de cellules vivantes selon la revendication 10, caractérisé en ce que le dispositif de sélection (2) comprend:

- deux récipients (20,21) ou plus permettant de recevoir et maintenir des cultures de cellules vivantes en suspension,
- un ensemble de moyens permettant d'alimenter ces récipients en substrat
- 25 (24),
- un ensemble de moyens (28-31) permettant de transférer le contenu d'un récipient (20) dans l'autre (21) et vice-versa
- un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients vers un autre dispositif tel qu'un récipient bioréacteur (1)
- 30 - un ensemble de moyens permettant d'évacuer tout ou partie du contenu de ces récipients (20,21) vers une poubelle.

12. Un dispositif de culture de cellules vivantes par couplage

avec un automate de sélection de cellules vivantes selon la revendication 11 comprenant :

- A : un dispositif de sélection de cellules vivantes (2) comprenant
  - (a) au moins un premier et au moins un deuxième récipient de culture (20, 21) destinés à recevoir une culture (22)
  - (b) une source de gaz (23),
  - (c) une source de milieu (24),
  - (d) une source (25) pour un agent stérilisant; et
  - (e) un système de conduites comportant des moyens pour relier au choix l'un des deux récipients de culture (20 ou 21) à la source de milieu (24) tels que des vannes ainsi que les deux récipients de culture (20, 21) entre eux et pour relier au choix l'autre récipient de culture (20 ou 21) à la source (25) de l'agent stérilisant.
- B : un récipient bioréacteur (1)
- C : un système de conduites (5,6) comportant des moyens pour relier le dispositif de sélection au récipient bioréacteur (1),
- D : optionnellement une conduite (15) comportant des moyens pour relier le récipient bioréacteur (1) à un dispositif de séparation solide-liquide tel qu'un décanteur (16),
- E : optionnellement une conduite (7) d'évacuation du fluide (eau par exemple) traité,
- F : optionnellement un dispositif de régulation de température.



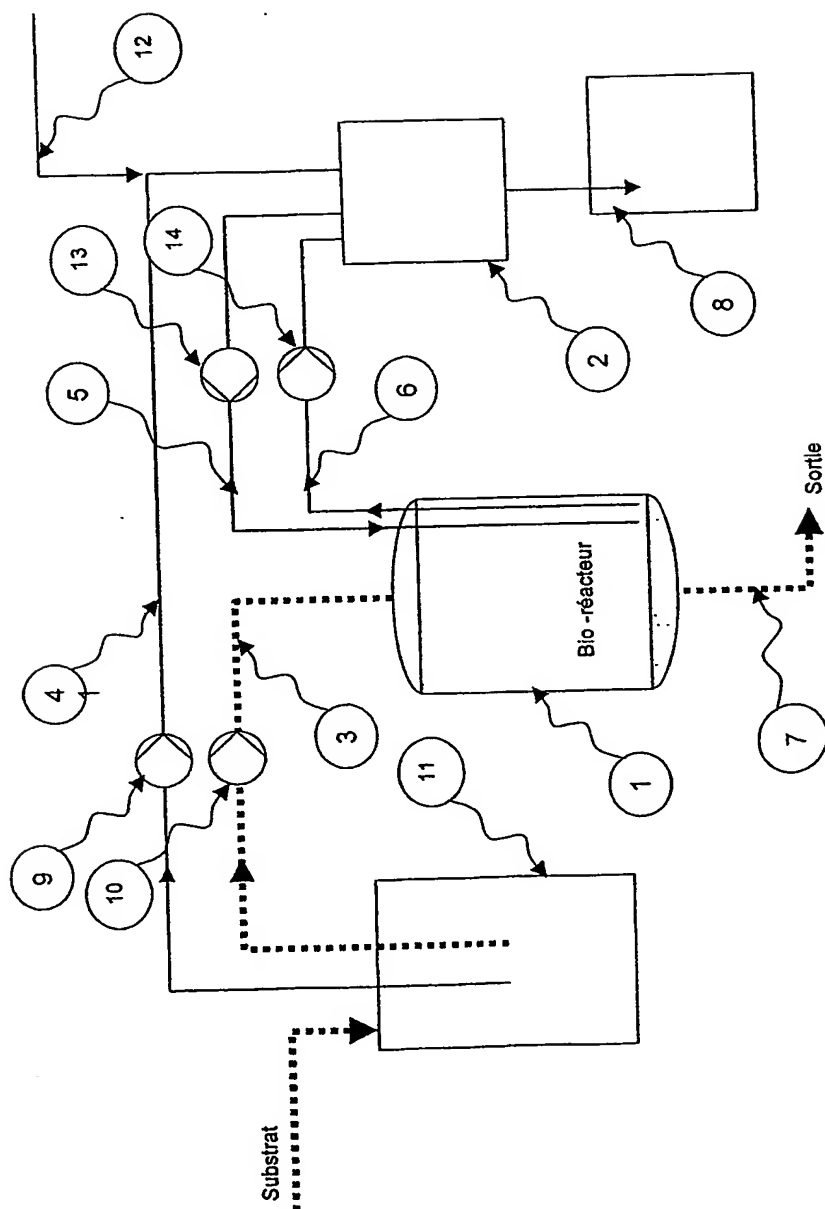


Figure 1

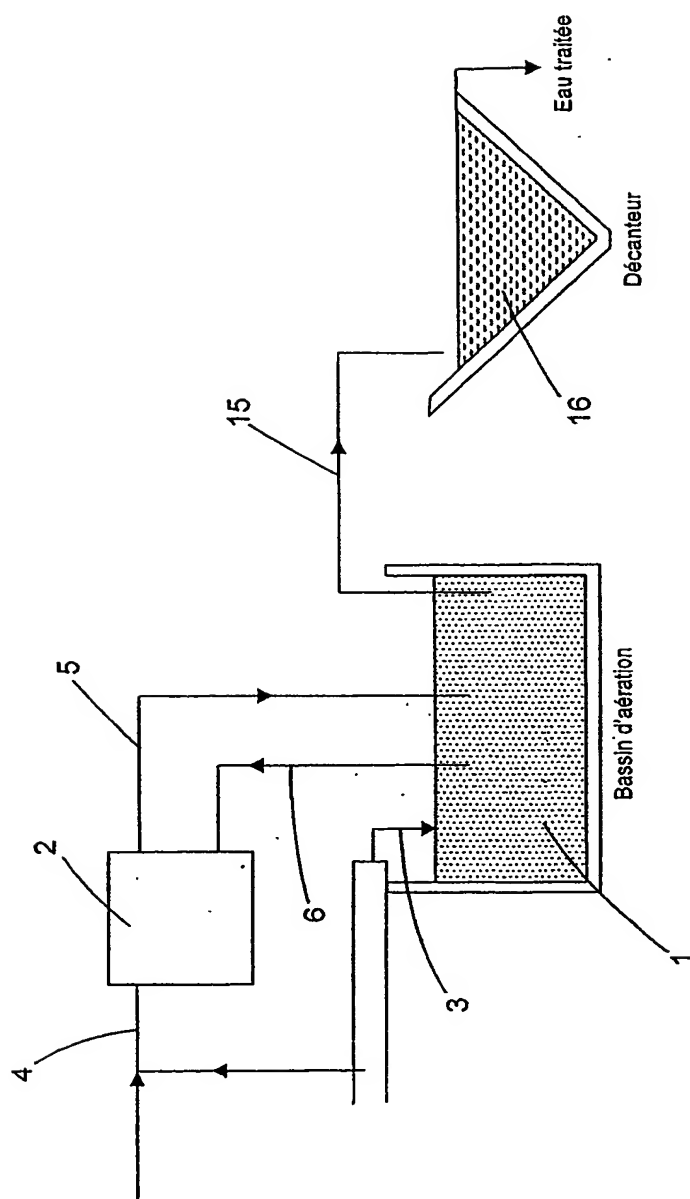


Figure 2

3 / 3

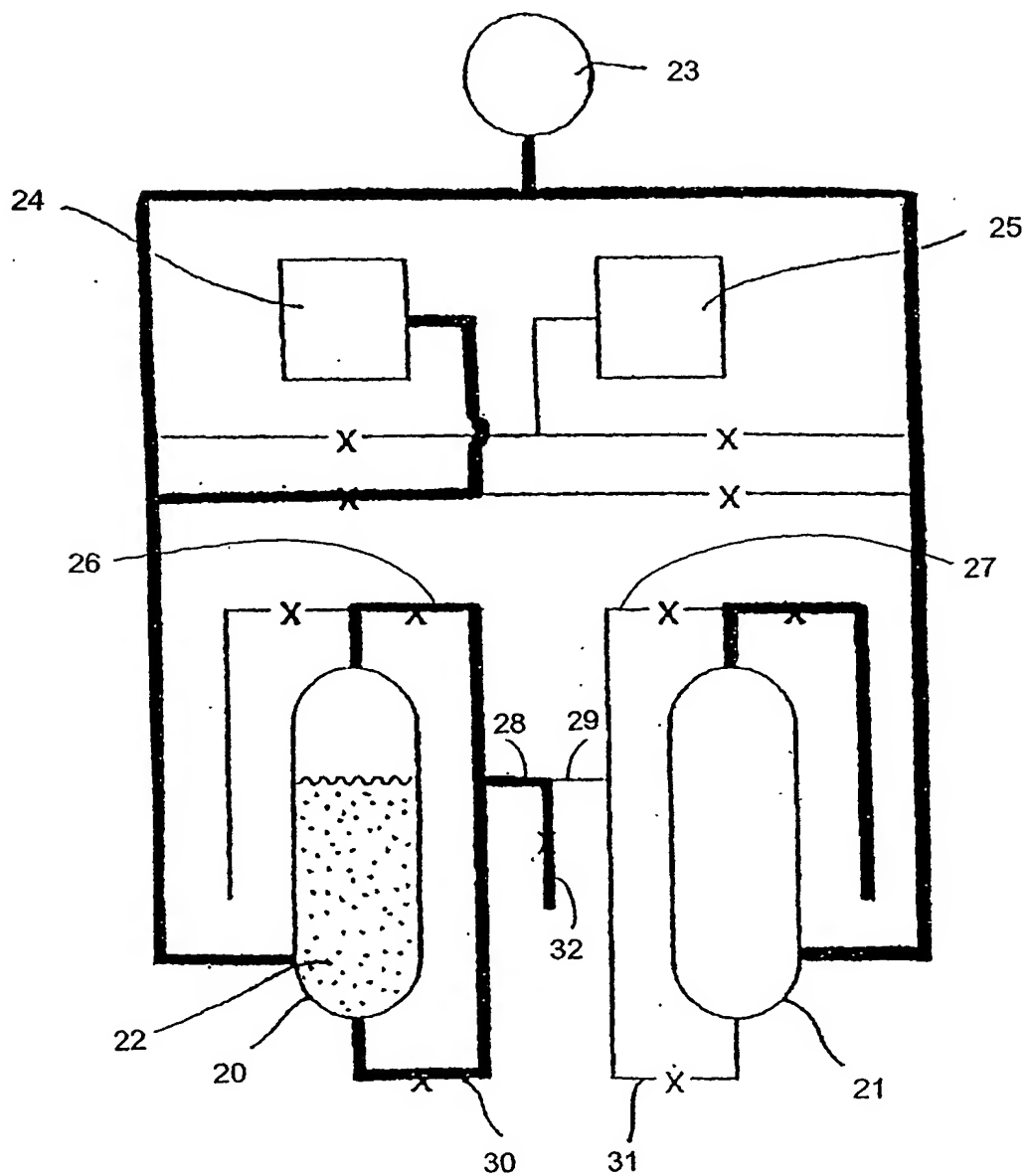


Figure 3